

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 1/04, A23K 3/03, A23L 1/03, A23K 1/00 // (C12N 1/04, C12R 1:25)	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57242 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/02925 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. April 1999 (29.04.99) (30) Prioritätsdaten: 198 19 475.7 30. April 1998 (30.04.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RUNGE, Frank [DE/DE]; Burgunderstrasse 1a, D-67133 Maxdorf (DE). COOPER, Bryan [US/DE]; Robert-Blum-Strasse 5, D-68199 Mannheim (DE). BRÖCKEL, Ulrich [DE/DE]; Marcignysstrasse 11, D-67251 Freinsheim (DE). HEINZ, Robert [DE/DE]; Ungsteiner Strasse 11, D-67067 Ludwigshafen (DE). HARZ, Hans-Peter [DE/DE]; Am Mönchsbusch 22, D-67373 Dudenhofen (DE). EIDELSBURGER, Ulrich [DE/DE]; Lindenweg 4, D-67258 Hessheim (DE). KÄSLER, Bruno [DE/DE]; Magdeburger Strasse 72, D-67071 Ludwigshafen (DE). KELLER, Thomas [DE/DE]; In der Halt 5, D-67308 Lautersheim (DE).	(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Ludwigsplatz 4, D-67059 Ludwigshafen (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: <u>DRIED MICROORGANISM CULTURES AND METHOD FOR PRODUCING SAME</u> (54) Bezeichnung: TROCKENE MIKROORGANISMENKULTUREN UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG (57) Abstract The invention relates to dried microorganism cultures containing at least one microorganism species on a support, characterized in that they are present in the form of particles which a) have a particle size of at least approximately 0.1 mm and b) are compacted. The invention also relates to a method for producing dried microorganism cultures and to their use in the production of food and animal feed. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft trockene Mikroorganismenkulturen, enthaltend wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies in getragener Form, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie in Form von Partikeln vorliegen, welche a) eine Partikelgröße von wenigstens etwa 0,1 mm aufweisen und b) verdichtet sind; Verfahren zur Herstellung trockener Mikroorganismenkulturen sowie deren Verwendung zur Herstellung von Nahrungs- und Futtermitteln.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Trockene Mikroorganismenkulturen und Verfahren zu deren Herstellung

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige trockene Mikroorganismenkulturen, welche insbesondere zur Herstellung von Nahrungs- und Futtermitteln brauchbar sind, sowie Verfahren zur Herstellung
10 trockener Mikroorganismenkulturen.

Ein Hauptanwendungsgebiet von Mikroorganismen, wie Bakterien und Hefen, ist die Herstellung von Nahrungsmitteln und Futtermitteln. So werden beispielsweise Milchsäurebakterien, wie zum Beispiel
15 solche der Gattung Streptococcus sp. oder Lactobacillus sp., bei der Herstellung von Milchprodukten, wie Sauerrahm, Buttermilch, Joghurt, Kefir, Kumis, Quark sowie bei der Herstellung von Sauer-
teig und zur Konservierung von Rohwurst, wie z. B. Salami, verwendet. Bei der Herstellung von Futtermitteln, wie z. B. Silage,
20 kommen ebenfalls Milchsäurebakterien, wie z. B. solche der Gattung Lactobacillus sp., zum Einsatz.

Die zur Herstellung von Nahrungs- und Futtermitteln erforderlichen Mikroorganismenpräparate kommen gewöhnlich in Form sogenannter Starterkulturen zum Einsatz. Hierbei handelt es sich zumeist
25 nicht um frisch hergestellte Flüssigkulturen, sondern entweder um gewöhnlich in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Kulturen oder Trockenpräparate. Trockenpräparate sind üblicherweise bevorzugt, da deren Transport und Lagerung im Vergleich zu tiefgefrorenen
30 Präparaten technisch weniger aufwendig ist.

Aus dem Stand der Technik sind unterschiedlichste Formen trockener Zubereitungen von Mikroorganismenkulturen bekannt. So beschreibt beispielsweise die EP-A-0 131 114 ein Lactobacillusprä-
parat, wobei eine Zellsuspension der Bakterien auf eine pulver-
35 oder granulatförmige Trägermasse aufgetragen und getrocknet wird. Zur Lagerung des Präparates ist es jedoch erforderlich, dieses in einer sauerstofffreien Schutzgasatmosphäre zu verpacken. In der DD 840493952 wird vorgeschlagen, kultivierte Mikroorganismen-
stämme zur Herstellung von Starterkulturen gefrierzutrocknen, in
40 Folie zu verpacken und bei 279 bis 288 Kelvin zu lagern. Die JP-A-06/217713 beschreibt die Herstellung spezieller Lactobacillus-Starterkulturen durch Sprühtrocknung. In der EP-A-0 202 409 wird vorgeschlagen, Trockenkulturen einer Nassgranulierung zu unter-
ziehen, das Granulat zu kugelförmigen Partikeln zu verarbeiten
45 und anschließend zu trocknen. Außerdem wird in einer Reihe von

Publikationen vorgeschlagen, beschichtete trockene Bakterienpräparate bereitzustellen (vgl. z. B. US-A-3,677,897).

Für die Herstellung trockener Mikroorganismenpräparate werden im
5 Stand der Technik eine Reihe unterschiedlicher Verfahren beschrieben. Neben den oben bereits erwähnten Gefriertrocknungs- und Wirbelschichttrocknungsverfahren stellt eine weitere Herstellungsalternative die Sprühtrocknung einer Mikroorganismensuspension dar. So beschreiben beispielsweise Stadhouders, J. et al.,
10 in Neth. Milk Dairy J. (1969) 23, 182 die Sprühtrocknung von Milchsäurebakterien bei 70 °C, gekoppelt mit einem Nach Trocknungsschritt bei 27 °C im Vakuum. Zur Trocknung wird offensichtlich keine vorkonditionierte, d. h. vorgetrocknete Luft verwendet. Dem Sprühgut wird vor der Trocknung eine Calciumhydroxidaufschlämmung
15 zugesetzt. Das bei der Sprühtrocknung gebildete Calciumlactat ist insofern von Vorteil, als es eine geringere Hygroskopizität aufweisen soll. In anderen, aus dem Stand der Technik bekannten Sprühtrocknungsverfahren werden Bakteriensuspensionen versprüht, denen zuvor verschiedenste Trägermaterialien zugesetzt wurden. So
20 wird beispielsweise gemäß SU 724113 eine mit Trockenmilchpulver, Melasse und Natriumglutamat versetzte Bakteriensuspension versprüht. Gemäß SU 1616990 wird eine mit dem Mineral Palygorskit versetzte Bakteriensuspension sprühgetrocknet. Die WO-A-88/06181 beschreibt die Sprühtrocknung einer mit Ton versetzten Bakterien-
25 suspension. Die JP-A-69/67989 beschreibt die Sprühtrocknung von Hefe- oder Bakterienzellen, welche in einer neutralen oder schwach sauren Lösung suspendiert sind, die Proteine, Carboxymethylcellulose, Alginat oder Alginatester, Di- oder höhere Saccharide oder mehrwertige Alkohole enthält.

30 Die bisher aus dem Stand der Technik bekannten trockenen Mikroorganismenpräparate, insbesondere solche, welche für die Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln Verwendung finden, weisen wenigstens einen der folgenden Nachteile auf:

35

1) Der Gehalt lebensfähiger Keime pro Gewichtseinheit des Trockenmaterials ist herstellungsbedingt sehr gering, so dass große Volumina des Trockenpräparates bei der Endanwendung einzusetzen sind;

40

2) die Lagerstabilität ist zu gering, so dass die Trockenpräparate innerhalb weniger Wochen verbraucht werden müssen, wenn keine Lagerung unter technisch aufwendigen Bedingungen möglich ist;

45

- 3) die Trockenpräparate weisen einen hohen Staubanteil auf, wodurch deren Verarbeitung erschwert wird;
- 4) die mechanische Stabilität ist sehr gering, so dass bei Abmischungen der Präparate mit mineralischen Zusätzen ein feinteiliger Abrieb gebildet wird und eine Entmischung des Feststoffpräparates zu beobachten ist;
- 5) die Lösungsgeschwindigkeit der Trockenpräparate ist nicht zufriedenstellend, so dass der gewünschte mikrobiologische Prozess für die Herstellung des Nahrungs- oder Futtermittels nur langsam anläuft und unerwünschten Mikroorganismen die Möglichkeit zur Vermehrung gegeben wird, was zu erheblichen Qualitätsverlusten führen kann.

Auch die aus dem Stand der Technik bisher bekannten Herstellungsverfahren, insbesondere die bisher beschriebenen Sprühtrocknungsverfahren, sind aus wenigstens einem der folgenden Gründe nicht zufriedenstellend:

- 1) die Verfahren sind technisch sehr aufwendig;
- 2) die Überlebensrate der Mikroorganismen bei der Trocknung ist zu gering;
- 3) der Feuchtegehalt des Trockenproduktes ist zu hoch.

Eine erste Aufgabe der vorliegenden Erfindung betrifft somit die Bereitstellung verbesserter trockener Mikroorganismenkulturen, welche die oben genannten, aus dem Stand der Technik bekannten Mängel weitgehend nicht mehr aufweisen. Insbesondere sollen gegenüber dem Stand der Technik verbesserte Starterkulturen bereitgestellt werden. Die erfindungsgemäßen Starterkulturen sollen vor allem eine verbesserte Herstellung von Silage ermöglichen.

Eine zweite Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung verbesserter Verfahren zur Herstellung trockener Mikroorganismenkulturen. Insbesondere sollte ein verbessertes Verfahren zur Sprühtrocknung von Mikroorganismenkulturen bereitgestellt werden, welches die Herstellung von Trockenpräparaten mit einem hohen Gehalt an lebensfähigen Keimen und hoher Lagerstabilität ermöglicht.

Gelöst wird obige erste Aufgabe durch Bereitstellung einer trockenen Mikroorganismenkultur, enthaltend wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies in geträgerter Form, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultur in Form von Partikeln vorliegt, welche

5

- a) eine Partikelgröße von wenigstens etwa 0,1 mm aufweisen und
- b) verdichtet sind.

- 10 Die erfindungsgemäßen partikelförmigen Kulturen sind aufgrund der gewählten Korngröße praktisch staubfrei. Der Staubanteil liegt vorzugsweise im Bereich von etwa 0,01 bis 0,05 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der Trockenkultur. Dies entspricht einer mit einem Casella-Gerät gravimetrisch bestimmten Staubzahl im Bereich von etwa 1 bis 12 .

Die erfindungsgemäßen Partikel besitzen außerdem einen verdichteten, d.h. kompakten Aufbau. Diesen erreicht man vorzugsweise durch einen später genauer erläuterten und bisher für trockene

- 20 Mikroorganismenpräparate bisher nicht beschriebenen Verdichtungsschritt bei deren Herstellung. Dabei wird ein, beispielsweise durch Sprüh-, Gefrier- oder Wirbelschichttrocknung erhaltenes pulverförmiges Vorprodukt (wie z.B. das später beschriebene, mit einer erfindungsgemäßen Sprühtrocknungsvariante erhältliche Pul-
- 25 verkonzentrat), das gewöhnlich einen signifikanten Staubanteil (z.B. eine Staubzahl von etwa 25 bis 100) aufweist, mechanisch verdichtet.

- Die Verdichtung kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß man das pulverförmige Vorprodukt unter Einwirkung von Linienkräften, z.B. im Bereich von etwa 5 bis etwa 25 kN/cm, insbesondere etwa 10 bis etwa 15 kN/cm, z. B. in herkömmlichen Kompaktiervorrichtungen kompaktiert. Das Vorprodukt kann aber auch unter Einwirkung von Drücken im Bereich von etwa 50 bis etwa 250 MPa, insbesondere im
- 35 Bereich von etwa 80 bis 200 MPa, wie z.B. etwa 90 bis etwa 160 MPa, z.B. in üblichen Tablettenpressen, tablettiert werden. Besonders bevorzugt ist die Verdichtung durch Kompaktieren. Weiterhin bevorzugt ist die Kompaktierung erfindungsgemäß durch Sprühtrocknen erhaltener Pulverkonzentrate.

40

- Durch die Bereitstellung von Mikroorganismenkulturen des oben beschriebenen Typs wird überraschenderweise erreicht, dass die Verarbeitung, insbesondere als Starterkulturen, deutlich vereinfacht wird und außerdem die mechanische Stabilität der Partikel und so-
- 45 mit die Gefahr der Entmischung von Starterkulturpräparaten deutlich verringert wird. Überraschenderweise wurde auch festgestellt, daß die Verdichtung des pulverförmigen Vorprodukts die

Produktqualität bezüglich der Anzahl lebensfähiger Keime praktisch nicht beeinträchtigt. Vielmehr wird durch die erzielte hohe Dichte das Eindringen von Luft und Feuchtigkeit in die erfindungsgemäßen Trockenpräparate so signifikant verringert, daß eine wesentliche Verbesserung der Lagerstabilität erreicht werden kann. So konnten beispielsweise Überlebensraten von 60% und mehr nach einjähriger Lagerung bei Raumtemperatur erzielt werden. Derart vorteilhafte Lagerstabilitätsdaten wurden bisher nicht beschrieben.

10

Insbesondere können die verdichteten Partikel kompaktiertes Brechgut (d.h. durch Zerkleinern und gegebenenfalls Klassieren von kompaktierten Produktsträngen erhaltenes Material) mit einem Durchmesser von etwa 0,1 mm bis etwa 2 mm, vorzugsweise 0,3 bis 1,25 mm, umfassen. Der Durchmesser stellt dabei einen rechnerisch aus der Massensummenverteilung der verdichteten Partikel ermittelten Wert dar und entspricht dem Durchmesser massengleicher Kugeln. Die Bruchkantenlänge der Partikel liegt etwa im Bereich von 0,1 bis 2 mm, insbesondere etwa 0,1 bis 1,4 mm.

20

Die verdichteten Partikel können außerdem als Tabletten beliebiger Form, wie z.B. rund, eckig oder oval, mit einem Durchmesser von etwa 2 bis 50 mm und einem Verhältnis von Durchmesser zu Dicke von etwa 1:0,1 bis etwa 10:1, insbesondere etwa 1:1 bis etwa 5:1, vorliegen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthalten die trockenen Mikroorganismenkulturen als weitere Komponente einen Brausezusatz, umfassend eine Säurekomponente, wie z. B. eine organische, nichtflüchtige Carbonsäure, und eine gasbildende Komponente, wie z. B. eine CO₂-bildende Komponente. Derartige Brauseformulierungen besitzen den besonderen Vorteil einer überraschend schnellen Auflösung nach Applikation der Starterkultur. Als Folge dieser schnellen Auflösung der Starterkultur in dem sie umgebenden Milieu ist eine rasche Vermehrung der Starterkulturmikroorganismen gewährleistet, wodurch Qualitätsverluste des mit Hilfe der Starterkultur herzustellenden Produkts überraschend gut vermeidbar sind.

Vorzugsweise enthält eine erfindungsgemäße verdichtete Trockenkultur als Träger wenigstens ein Matrixmaterial zur Einbettung der Mikroorganismenzellen und gegebenenfalls wenigstens ein weiteres, die Zellen stabilisierendes Additiv.

Der in den erfindungsgemäßen Trockenkulturen verwendete Träger umfasst wenigstens eine, üblicherweise frisch gezüchteten Mikroorganismen vor der Trocknung als Coformulans zugesetzte Matrix-

- komponente, ausgewählt unter Mono-, Oligo- und Polysacchariden, Polyolen, Polyethern, Polymeren, wie CMC oder PVP, Oligo- und Polypeptiden, aus natürlichen Quellen, wie z.B. Milch, Fleisch oder Getreide, abgeleitete Stoffe oder Stoffgemische, wie z.B. Süßmol-
- 5 kepulver, Weizengrießkleie, Pepton, Alginate, mineralischen Verbindungen, oder Gemischen solcher Matrixsubstanzen. Weiterhin können stabilisierend wirkende Additive zusammen mit der Matrixsubstanz oder später zugesetzt werden, beispielsweise Antioxidantien, wie α -Tocopherol oder Ascorbinsäure, oder Gemische davon.
- 10 Darüber hinaus können weitere Substanzen stabilisierend wirken, die ausgewählt sind unter anorganischen Salzen, wie Alkali- oder Erdalkalichloride, anorganischen oder organischen Puffern, wie Alkaliphosphatpuffer, Aminosäuren, wie Asparagin- oder Glutaminsäure und den Salze davon, organischen Carbonsäuren, wie Cit-
- 15 nensäure, organischen, nichtflüchtigen Lösungsmitteln, wie DMSO, und weiteren Verbindungen, wie β -Carotin und Gemischen solcher Additive.

- Die erfindungsgemäßen Mikroorganismenkulturen umfassen vorzugs-
- 20 weise lebensfähige Mikroorganismen in einer Konzentration von 10^8 bis 10^{12} cfu (colony forming units)/g Trockenkultur. Die erfindungsgemäß hergestellten Pulverkonzentrate enthalten etwa $5 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^{12}$, vorzugsweise etwa $4 \cdot 10^{11}$ bis $8 \cdot 10^{11}$ cfu/g. Die erfindungsgemäßen verdichteten Kulturen enthalten etwa $1 \cdot 10^{11}$ bis
- 25 $4 \cdot 10^{11}$, insbesondere etwa $3 \cdot 10^{11}$ cfu/g. Starterkulturen zur Silageherstellung enthalten etwa 1 bis $7 \cdot 10^{10}$, insbesondere etwa $3 \cdot 10^{10}$ cfu/g.

- Dabei können die Mikroorganismen von einer oder mehreren Mikroor-
- 30 ganismenspezies abgeleitet sein. Eine besonders bevorzugte Spezies sind Milchsäure produzierende Bakterien, wie z.B. solche, die zur Silageherstellung geeignet sind, wie beispielsweise *Lactobacillus plantarum*.

- 35 Silage im Sinne der vorliegenden Erfindung umfaßt durch Einwirkung von Mikroorganismen haltbar gemachten Futterpflanzenprodukte, beispielsweise basierend auf Gras, Klee, Stroh, Maispflanzen, Futterrüben, Hülsenfrüchten, Getreide, wie z.B. Mais und Weizen, und dergleichen.

40

- Die oben beschriebene zweite Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird überraschenderweise gelöst durch Bereitstellung eines Sprüh-
- 45 trocknungsverfahrens zur Herstellung einer trockenen Mikroorganismenkultur, enthaltend wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies in getragener Form, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) in einer wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies enthaltende Flüssigkeit wenigstens eine zur Ausbildung eines Trägers geeignete Substanz löst oder suspendiert,
- 5 b) das so erhaltene Gemisch in einem Sprühtrockner trocknet, wobei man zur Sprühtrocknung ein konditioniertes, getrocknetes und auf eine Temperatur im Bereich von mehr als etwa 80 °C, insbesondere auf etwa 90 bis etwa 135 °C, vorzugsweise etwa 100 bis etwa 110 °C, wie z.B. etwa 105 °C erhitztes Gas verwendet, und
- 10 c) das Trockengut aus dem Sprühtrockner entfernt, wobei dieses eine Austrittstemperatur von etwa 40 bis 85 °C, insbesondere etwa 45 bis 75 °C, vorzugsweise etwa 50 bis 65 °C, wie z.B. etwa 55 °C, aufweist.
- 15

Dieses erfindungsgemäße Sprühtrocknungsverfahren wird im folgenden auch als trägergebundenes Sprühtrocknungsverfahren bezeichnet. Das zur Trocknung verwendete Gas ist vorzugsweise ein getrocknetes Gas mit einem Taupunkt von weniger als +5 °C, insbesondere mit einem Taupunkt von etwa -10 bis etwa -50 °C, wie z. B. konditionierte Pressluft oder konditionierter Stickstoff. Beispielsweise kann Pressluft mit einem Taupunkt von etwa -25 °C und Stickstoff mit einem Taupunkt von etwa -40 °C eingesetzt werden.

20 Ein Taupunkt von +5 °C entspricht in etwa 5 g Wasser pro m³ Luft.

25

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sprühtrocknungsverfahrens wird in einer nachgeschalteten, weiteren Stufe d) das Trockengut einer Nachtrocknung unterzogen. Die Nachtrocknungstemperatur liegt im Bereich von etwa 15 bis 50 °C, wie z. B. bei etwa 25 bis 40 °C. Die Nachtrocknung erfolgt beispielsweise in einer Gasatmosphäre oder im Vakuum; alternativ dazu besteht außerdem die Möglichkeit, ein Trocknungsmittel mit dem gemäß Stufe c) erhaltenen trockenen Mikroorganismenpräparat

30 homogen zu vermischen.

35

Aufgrund seiner Auslegung gestattet das erfindungsgemäße Sprühtrocknungsverfahren überraschenderweise die Trocknung von Mikroorganismensuspensionen mit Überlebensraten bis zu 100 %. Aufgrund der Verwendung von konditioniertem Gas bei der Sprühtrocknung sowie dem optionalen Nachtrocknungsschritt werden überraschenderweise Trockenpräparate mit extrem niedrigem Feuchtegehalt (von etwa 2 bis 3 Gew.-% Wasser), entsprechend einer Wasseraktivität a_w von 0,03 bis 0,15, zur Verfügung gestellt. Dies hat unmittelbar zur Folge, dass die erfindungsgemäß sprühgetrockneten und gegebenenfalls nachgetrockneten Mikroorganismenkulturen über-

40

45

lebensraten von bis zu 60 % nach einjähriger Lagerung bei Umgebungstemperatur und Umgebungsluft aufweisen.

Aufgrund der überraschend hohen Überlebensrate bei der oben beschriebenen Sprühtrocknung ist der Gehalt an lebensfähigen Mikroorganismen ausgeprägt hoch. Das erhaltene Sprühtrocknungsprodukt wird daher auch als Pulverkonzentrat bezeichnet und kann zur Verringerung der Konzentration lebensfähiger Zellen je nach Anwendungsgebiet weiter verdünnt werden. Das Pulverkonzentrat eignet sich besonders zur Herstellung der oben beschriebenen erfindungsgemäßen verdichteten, partikelförmigen Kulturen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher außerdem ein Verfahren zur Herstellung der oben beschriebenen, verdichteten Mikroorganismenkulturen, wobei man

- i) durch trägergebundene Sprühtrocknung, trägergebundene Gefriertrocknung oder trägergebundene Wirbelschichttrocknung ein Pulverkonzentrat der Mikroorganismenkultur herstellt,
- ii) das Pulverkonzentrat gegebenenfalls mit einem oder mehreren Coformulantien versetzt und
- iii) diese Mischung durch Kompaktieren oder Tablettieren verdichtet.

Vorzugsweise wird die verdichtete Mischung in einem weiteren Verfahrensschritt gebrochen, d.h. zerkleinert, und gegebenenfalls unter Verwendung eines Siebs mit geeigneter Maschenweite zu verdichtetem Granulat der gewünschten Größe klassiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer trockenen, agglomerierten Mikroorganismenkultur, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

- i) durch trägergebundene Sprühtrocknung, trägergebundene Gefriertrocknung oder trägergebundene Wirbelschichttrocknung ein Pulverkonzentrat der Mikroorganismenkultur herstellt,
- ii) das Pulverkonzentrat gegebenenfalls mit einem oder mehreren Coformulantien versetzt und
- iii) diese Mischung durch Agglomerieren verdichtet.

Unter "trägergebunden" versteht man dabei die Anwesenheit zumindest eines Matrixmaterials des oben beschriebenen Typs bei der Trocknung.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der oben genannten Kompaktierungs- oder Tablettierungs- bzw. Agglomerierungsverfahren wird Stufe i) insbesondere entsprechend dem oben beschriebenen
5 Sprühtrocknungsverfahren durchgeführt.

Das durch die oben beschriebenen Verdichtungsverfahren erhaltene Produkt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch als verdichtetes oder kompaktiertes Trockenkonzentrat bezeichnet (cfu-
10 Bereich etwa $1 \cdot 10^{10}$ bis $1 \cdot 10^{11}$) und kann als solches, z.B. als konzentrierte Starterkultur, vertrieben werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen verdichteten, trockenen Mikroor-
15 ganismenkulturen als Starterkulturen für die Herstellung von Nahrungsmitteln, wie z. B. für die Herstellung von Milchprodukten, wie Sauerrahm, Buttermilch, Joghurt, Kefir, Kumis, Quark, für die Herstellung von Sauerteig, Rohwurst, sowie für die Herstellung von Futtermitteln, wie z. B. Silage. Zu diesem Zweck wird die
20 Kultur gegebenenfalls nach Auflösen mit dem Nahrungs- oder Futtermittelsubstrat vermischt. Sollte die Zellzahl in der Starterkultur zu hoch sein, kann eine Verdünnung z.B. durch Vermischen mit einem inerten Feststoff, wie z.B. Kalk, insbesondere Futterkalk, angebracht sein.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind außerdem Nahrungs- und Futtermittel, welche mit Hilfe der erfindungsgemäßen Starterkulturen hergestellt worden sind.

30 Die vorliegende Erfindung wird in den nun folgenden Abschnitten unter Bezugnahme auf die beiliegende Figur genauer beschrieben.

Figur 1 zeigt schematisch eine mögliche Herstellungsweise von erfindungsgemäß kompaktiertem Granulat aus Pulverkonzentrat.

35

Verwendbare Mikroorganismen

Die vorliegende Erfindung ist grundsätzlich nicht auf bestimmte
40 Mikroorganismenkulturen beschränkt. Vielmehr erkennt der Fachmann, dass die vorliegende Erfindung auf jegliche Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und Hefen, anwendbar ist, welche unter den in vorliegender Beschreibung angegebenen Bedingungen in ein trockenes Mikroorganismenpräparat überführbar sind. Eine ge-
45 eignete Gruppe von Mikroorganismen, die erfindungsgemäß anwendbar sind, stellt die Gruppe der Milchsäure-produzierenden Bakterien dar. Insbesondere handelt es sich hierbei um Bakterien, welche zur homofermentativen Milchsäuregärung geeignet sind, d. h. Glu-

cose über den Fructosebisphosphat-Weg zu Lactat abbauen. Typische Vertreter dieser Gruppe sind Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. sowie *Pediococcus* sp. Als konkrete Beispiele für Lactobacillen können genannt werden *Lactobacillus* bulgaricus, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* und *Lactobacillus plantarum*. Beispiele für geeignete Streptokokken sind *Streptococcus* lactis, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*; und Beispiele für geeignete Pediococcen sind *Pediococcus cerevisiae* und *Pediococcus acidilactici*.

15

Fermentation der Mikroorganismen

Zur Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet man vorzugsweise frisch hergestellte Mikroorganismensuspensionen. Die für den jeweiligen Mikroorganismus optimalen Fermentationsmedien bzw. Fermentationsbedingungen sind entweder aus dem Stand der Technik bekannt oder können von dem mit der Aufzucht von Mikroorganismen betrauten Fachmann im Rahmen weniger Routineuntersuchungen bestimmt werden.

25

Gewöhnlich wird jedoch die Fermentation so durchgeführt, dass man, ausgehend von einer flüssigen oder halbfesten Vorkultur (Kulturvolumen etwa 10 bis 200 ml), frisch hergestelltes, steriles Fermentationsmedium unter sterilen Bedingungen animpft, wobei das Volumenverhältnis von Vorkultur zu Kulturmedium etwa 1:50 bis 1:200 betragen kann. Vorzugsweise verwendet man frisch gezüchtete Vorkulturen, welche sich in einer späten Phase des logarithmischen Wachstums befinden. Die Aufzucht erfolgt je nach zu züchtendem Mikroorganismus unter speziellen, optimierten Wachstumsbedingungen (wie Temperatur und pH). Gewöhnlich liegt die Aufzuchtstemperatur im Bereich von etwa 20 bis 40 °C, wobei jedoch beispielsweise bei Aufzucht thermophiler Bakterien deutlich höhere Temperaturen vorliegen können. Der Fermentationsansatz wird in gleichmäßiger Bewegung gehalten, beispielsweise durch moderates Rühren oder Einleiten von Luft oder Stickstoff, um die Ausbildung von Temperatur- oder Stoffgradienten zu verhindern und um auf diese Weise ein kontinuierliches Wachstum zu gewährleisten. Nach Beendigung der Wachstumsphase (beispielsweise bestimmt über das Erreichen einer bestimmten Zelldichte oder den Verbrauch eines der zugesetzten Nährstoffe), kann die Zellsuspension direkt

30

35

40

45

zur Herstellung der erfindungsgemäßen Trockenpräparate eingesetzt werden.

- 5 Es besteht jedoch außerdem die Möglichkeit, die erhaltene ursprüngliche Zellsuspension zur Erhöhung der Zellzahl weiter aufzukonzentrieren. Geeignete Methoden hierfür sind beispielsweise Zentrifugation, Ultrafiltration oder Dünnschichtverdampfung. Üblicherweise verwendet man jedoch zur Aufkonzentrierung der
- 10 Zellsuspension eines Zentrifugationsschritt, welcher vorzugsweise bei verringerter Temperatur, nämlich im Bereich von etwa 4 bis 10 °C, durchgeführt wird.
- 15 Anstelle der Aufkonzentrierung oder in Kombination mit dieser besteht außerdem die Möglichkeit, die frisch gezüchtete Zellsuspension einem Waschschrift zu unterziehen, um die Aktivität möglicherweise negativ beeinflussende Kulturbestandteile, wie z. B. Stoffwechselprodukte, zu entfernen. Dabei geht man üblicherweise
- 20 so vor, dass man, vorzugsweise bei etwa 4 bis 10 °C, zunächst die ursprüngliche Kulturbrühe zu einer Suspension hoher Zelldichte aufkonzentriert und diese anschließend in einer geeigneten Pufferlösung aufnimmt und auf die gewünschte Zelldichte verdünnt. Erforderlichenfalls kann der Waschschrift auch mehrmals wieder-
- 25 holt werden. Erfindungsgemäß brauchbare Feststoffgehalte von Mikroorganismenkulturen, welche zur Herstellung der erfindungsgemäßen Trockenpräparate geeignet sind, liegen üblicherweise im Bereich von etwa 5 bis 25 Gew.-%, wie z.B. etwa 10 bis 20 Gew.-%.
- 30 Die Aufzucht der Mikroorganismen kann durch Batch-Fermentation oder kontinuierlich erfolgen.
- Zur weiteren Veranschaulichung der Erfindung wird im folgenden Abschnitt die Aufzucht eines Milchsäure-bildenden Bakteriums,
- 35 insbesondere *Lactobacillus plantarum*, näher beschrieben. Hierbei handelt es sich um ein insbesondere auf intakten und sich zersetzenden Pflanzen zu findendes Bakterium, welches besonders zur Herstellung von Silage-Futtermitteln geeignet ist.
- 40 Ein geeignetes Fermentationsmedium enthält pro Liter Medium etwa 40 bis 60 g Glucose, etwa 30 bis 60 g Hefeextrakt sowie einen Cocktail üblicher Spurenelemente, wie z. B. Magnesium, Mangan und gegebenenfalls Eisen. Der pH-Wert des Fermentationsmediums liegt
- 45 bei etwa 6 bis 7. Die Fermentationstemperatur liegt bei etwa 33 bis 38 °C. Durch Zugabe von steriler Natronlauge kann der pH-Wert des Fermentationsmediums im gewünschten Bereich gehalten werden.

Das Wachstum ist beendet, sobald kein Glucoseverbrauch bzw. keine Milchsäureneubildung mehr zu beobachten ist.

- 5 Gemäß einer erfindungsgemäß brauchbaren Variante der Lactobacillus-Fermentation wird nach Erreichen von etwa 80%igem oder 90%igem Wachstum die Temperatur des Fermentationsmediums auf etwa 42 bis 46 °C erhöht, bis die zugesetzte Glucose vollständig verbraucht ist. Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß sich auf diese Weise hergestellte Kulturen insbesondere bei der Sprüh-
- 10 trocknung besonders stabil verhalten, wodurch hohe Überlebensraten erzielbar sind. Vergleichbare Aufzuchtvarianten sind auch bei anderen erfindungsgemäß brauchbaren Mikroorganismen denkbar.
- 15 Nach beendetem Wachstum wird der Fermentationsansatz auf die gewünschte Zelldichte gebracht. Gewünschtenfalls kann die Zellsuspension gewaschen werden, bis sie praktisch lactatfrei ist. Die Zellzahl einer erfindungsgemäß brauchbaren Mikroorganismensuspension liegt gewöhnlich im Bereich von etwa 1×10^{10} bis etwa 5×10^{12} cfu/g Suspension.
- 20

Trägersubstanzen

- 25 Die erfindungsgemäß hergestellten trockenen Mikroorganismenkulturen enthalten neben gegebenenfalls nicht-flüchtigen Bestandteilen aus dem jeweiligen Fermentationsansatz, wie z. B. Stoffwechselprodukte, wenigstens ein Matrixmaterial und gegebenenfalls weitere stabilisierende Substanzen. Diese Coformulantien sind vorzugsweise ausgewählt unter anorganischen Salzen oder Puffern, we-
- 30 nigstens einer weiteren Verbindung, die ausgewählt ist unter Mono-, Oligo- und Polysacchariden, Polyolen, Polyethern, Aminosäuren, Oligo- und Polypeptiden, von Milch abgeleiteten Verbindungen, organischen Carbonsäuren, mineralischen Verbindungen, organischen Trägermaterialien, wie z. B. Weizengrießkleie, Alginate, DMSO, PVP (Polyvinylpyrrolidon), CMC (Carboxymethylcellulose), α -Tocopherol, β -Carotin und Gemischen davon.
- 35
- 40 Als Beispiele für geeignete Saccharid-Trägerkomponenten sind zu nennen Saccharose, Fructose, Maltose, Dextrose, Lactose und Maltodextrin. Als Beispiel für ein geeignetes Polyol ist Glycerin zu nennen. Beispiele für geeignete Aminosäuren sind Glutaminsäure, Asparaginsäure und die Salze davon. Als Beispiel für einen geeigneten peptidischen Träger ist zu nennen Pepton. Als Beispiele für
- 45 von Milch abgeleiteten Verbindungen ist neben oben genanntem Maltodextrin auch Süßmolkepulver zu nennen. Geeignete organische Carbonsäuren sind beispielsweise Zitronensäure, Äpfelsäure und l-

Ascorbinsäure. Beispiele für geeignete mineralische Träger sind Montmorillonit sowie Palygorskit.

5 Vorzugsweise verwendet man jedoch als Träger für die erfindungs-
gemäßen trockenen Mikroorganismenpräparate Gemische oben genann-
ter Stoffklassen. Derartige Gemische umfassen vorzugsweise als
Hauptkomponente ein Matrixmaterial, wie z. B. eine der oben ge-
nannten Saccharidkomponenten oder beispielsweise Süßmolkepulver,
10 und gegebenenfalls einen Nebenanteil wenigstens einer weiteren
Komponente, wie z. B. eine Pufferkomponente (beispielsweise Ci-
tronensäure) oder ein Antioxidans (beispielsweise l-Ascorbinsäure
oder α -Tocopherol). Der Zusatz weiterer stabilisierender Bestand-
teile, wie z. B. Natriumglutamat und/oder Pepton, hat sich eben-
falls als vorteilhaft erwiesen.

15

Die Matrixkomponente wird in erfindungsgemäß brauchbaren Träger-
gemischen üblicherweise in etwa 5- bis 30facher Menge der übrigen
Trägerbestandteile verwendet. Beispiele für besonders geeignete
20 Trägerkombinationen sind:

- a) Süßmolkepulver/Citronensäure/l-Ascorbinsäure (Gewichtsver-
hältnis etwa 40:1:1).
- 25 b) Maltodextrin/Lactose/Citronensäure/l-Ascorbinsäure (Gewichts-
verhältnis etwa 20:20:1:1), gegebenenfalls ergänzt mit etwa
1,5 Teilen β -Carotin und 0,5 Teilen α -Tocopherol je Teil Ci-
tronensäure.
- 30 c) Maltodextrin/Natriumglutamat/l-Ascorbinsäure (Gewichtsver-
hältnis etwa 10:1,5:1).
- d) Lactose/Glucose/Pepton/Citronensäure (Gewichtsverhältnis etwa
6:6:1,2:1).

35

Die erfindungsgemäßen Trägersubstanzen können der Mikroorganis-
mensuspension entweder als Feststoff oder in gelöster Form zuge-
40 geben werden. Vorzugsweise stellt man jedoch eine sterile Lösung
des/der Träger her, kühlt diese auf eine Temperatur von 4 bis
10 °C ab und vermischt diese mit der ebenfalls gekühlten Mikroor-
ganismensuspension unter leichtem Rühren. Zur Herstellung einer
homogenen Suspension rührt man das so erhaltene Gemisch unter
45 weiterem Kühlen über einen Zeitraum von etwa 10 Minuten bis 1
Stunde.

Herstellung trockener Mikroorganismenpräparate

Die in oben beschriebener Weise mit dem Träger versetzte Mikroorganismensuspension kann nun in unterschiedlicher Weise getrocknet werden. Als Trocknungsverfahren eignen sich prinzipiell die Gefriertrocknung, die Wirbelschichttrocknung sowie, vorzugsweise die Sprühtrocknung. Unter Sprühtrocknung im Rahmen der vorliegenden Erfindung versteht man auch modifizierte Sprühtrocknungsverfahren, wie z. B. die Sprühagglomeration oder die agglomerierende Sprühtrocknung. Letzteres Verfahren ist auch unter der Bezeichnung FSD (Fluidized Spray Dryer) Verfahren bekannt.

Die Gefriertrocknung zur Herstellung erfindungsgemäßer trockener Mikroorganismenkulturen kann beispielsweise in Anlehnung an die in der EP-A-0 259 739 oder der US-A-3 897 307 beschriebenen Gefriertrocknungsverfahren durchgeführt werden. Auf den Inhalt dieser Druckschriften wird hiermit in vollem Umfang Bezug genommen.

Ein geeignetes Wirbelschicht-Trocknungsverfahren wird beispielsweise beschrieben in der Dissertation von U. Kessler mit dem Thema "Experimentelle Untersuchung und Modellierung der Überlebensrate von Milchsäurebakterien bei der thermischen Trocknung", Technische Universität München, 1993. Auf den Inhalt dieser Druckschrift wird ebenfalls in vollem Umfang Bezug genommen. Zur Durchführung des Wirbelschicht-Trocknungsverfahrens ist es von Vorteil, das zu verwendende Trägermaterial, insbesondere die Matrixkomponente, in einer Wirbelschicht vorzulegen und diese mit der Mikroorganismensuspension in der von U. Kessler beschriebenen Weise zu besprühen.

Das erfindungsgemäß am meisten bevorzugte Trocknungsverfahren ist jedoch die Sprühtrocknung. Erfindungsgemäß brauchbar sind im Wesentlichen alle bisher bekannten Sprühtrocknungstechniken. Das Sprühgut kann beispielsweise im Gleichstrom oder im Gegenstrom getrocknet werden; die Versprühung kann mittels einer Ein- oder Mehrstoffdüse oder mittels eines Zerstäuberrades erfolgen.

Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet man Sprühgut mit einem Feststoffgehalt (nach Zugabe des Trägers) von etwa 10 bis 40, wie z. B. etwa 10 bis 25 Gew.-%.

Das erfindungsgemäße Sprühtrocknungsverfahren wird so durchgeführt, dass ein konditioniertes Trockengas mit einer Temperatur im Bereich von mehr als etwa 80 °C in die Trockenvorrichtung eingeleitet wird. Insbesondere sollte die Eintrittstemperatur im Be-

reich von etwa 90 bis 135 °C liegen. Besonders bevorzugt ist eine Trockentemperatur im Bereich von etwa 105 °C. Die Geschwindigkeit des Trocknungsverfahrens ist erfindungsgemäß so ausgelegt, dass die Austrittstemperatur des Trockengutes aus dem Trockner im Bereich von etwa 45 bis 75 °C, insbesondere im Bereich von etwa 50 bis 65 °C, vorzugsweise bei etwa 55 °C liegt.

Von besonderer Bedeutung für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Verwendung von vorkonditionierter, d. h. feuchtigkeitsarmer Trockenluft. Bevorzugt verwendet man Pressluft, deren Taupunkt bei etwa -25 °C liegt.

Das erfindungsgemäße Trocknungsverfahren ist so durchzuführen, dass im Trockengut eine möglichst geringe Restfeuchte vorliegt. Bevorzugt sollte die Wasseraktivität a_w im Trockengut weniger als 0,4 betragen. Zur weiteren Verbesserung der Langzeit-Lagerstabilität werden erfindungsgemäß jedoch Wasseraktivitätswerte von weniger als 0,15, vorzugsweise im Bereich von etwa 0,03 bis 0,1, angestrebt. Der prozentuale Wassergehalt liegt vorzugsweise etwa bei 2 bis 3 Gew.-%. Dies erreicht man am bevorzugtesten dadurch, dass man im Anschluss an den Sprühtrocknungsschritt einen Nachtrocknungsschritt anfügt. Das Trockengut wird hierzu beispielsweise in einem Wirbelbett, vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich von 15 bis 50 °C, über einen Zeitraum von beispielsweise 15 Minuten bis 20 Stunden nachgetrocknet. Als Trockengas dient wiederum vorzugsweise konditionierte Pressluft bzw. konditionierter Stickstoff. Die Nachtrocknung kann aber auch durch Anlegen eines Vakuums von etwa 1 bis 50 Torr über einen Zeitraum von etwa 15 Minuten bis 20 Stunden und bei einer Temperatur von etwa 15 bis 50 °C erfolgen. Hierbei ist ein Rühren des Trockengutes beispielsweise mit Hilfe eines Schaufelrührers bevorzugt.

Anstelle der oben beschriebenen physikalischen Nachtrocknungsverfahren ist es außerdem denkbar, dem bei der Sprühtrocknung erhaltenen Trockengut spezielle Trocknungsmittel zuzusetzen. Derartige Trocknungsmittel sollten ihrerseits eine sehr niedrige Wasseraktivität, wie z. B. einen a_w -Wert von 0,01 oder weniger, aufweisen. Als Beispiele für geeignete Trocknungsmittel sind zu nennen anorganische Salze, wie Calciumchlorid und Natriumcarbonat, organische Polymere, wie z. B. das unter der Handelsbezeichnung Kollidion 90 F erhältliche Produkt, sowie Siliciumdioxid-haltige Trocknungsmittel, wie Kieselgel, Zeolithe, sowie Trocknungsmittel, die unter der Handelsbezeichnung Tixosil 38, Sipernat 22 S oder Aerosil 200 erhältlich sind.

Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass trotz der relativ hohen Trocknungstemperaturen die Überlebensrate für die erfindungsgemäßen Trockenpräparate ausgezeichnete Werte von nämlich 75 % \pm 25 % zeigt.

5

Der Gehalt an lebensfähigen Mikroorganismen liegt im Bereich von etwa 5×10^8 bis 1×10^{12} cfu/g Trockensubstanz. Diese Präparate werden erfindungsgemäß auch als Pulverkonzentrate bezeichnet. Da für einzelne Endanwendungen auch geringere Gehalte an lebensfähigen Mikroorganismen völlig ausreichend sind, können derartige Pulverkonzentrate deshalb gegebenenfalls durch Vermengen mit weiteren inerten Trägermaterial auf die endgültige Zahl lebensfähiger Keime abgemischt werden.

15

Herstellung verdichteter trockener Mikroorganismenkulturen

Die durch oben beschriebene Trocknungsverfahren erhältlichen Pulverkonzentrate besitzen gewöhnlich einen relativ hohen Staubanteil und sind somit für einzelne Anwendungen noch nicht in zufriedenstellender Weise handhabbar. Außerdem erfordern verschiedene Anwendungen eine erhöhte mechanische Stabilität der Trockenkulturen. Es ist deshalb erforderlich, die Eigenschaften der oben beschriebenen Pulverkonzentrate durch einen weiteren Verdichtungsschritt zu verbessern.

Um den Staubanteil der erfindungsgemäßen Pulverkonzentrate zu verringern, besteht die Möglichkeit, diese in herkömmlicher Weise zu einem Granulat zu agglomerieren oder unter Anwendung äußerer Kräfte zu kompaktieren oder zu tablettieren.

Die Agglomeration stellt ein allgemein bekanntes Verfahren dar und wird beispielsweise beschrieben von Schade, A. und Leuenberger, H. in Kontinuierliche Wirbelschicht-Sprühgranulation, Chemie Ingenieur Technik (1992), 64, 1016; Uhlemann, H., Herstellung pharmazeutischer Granulate in einem kombinierten Feuchtgranulations-, und Mehrkammer-Wirbelschichttrocknungsverfahren, Chemie Ingenieur Technik (1990), 62, 822; oder Rosch, M. und Probst R., Granulation in der Wirbelschicht, Verfahrenstechnik (1975), 9, 59.

Erfindungsgemäß brauchbar ist die Agglomeration mit Hilfe eines Mischers. Hierzu füllt man das oben beschriebene Pulverkonzentrat in den Mischer und düst Öl, Wasser oder eine wässrige oder alkoholische Lösung von Zuckern, Polymeren oder anderen Zusatzstoffen

bei, um das Pulverkonzentrat zu agglomerieren.

5 Außerdem ist erfindungsgemäß brauchbar die Agglomerierung in einem Wirbelbett. Hierbei wird Pulverkonzentrat unter Gaszufuhr verwirbelt und mit einer wässrigen oder alkoholischen Lösung von Zuckern, Polymeren oder anderen Zusatzstoffen zum Agglomerataufbau besprüht. Geeignete Verfahren hierzu sind beispielsweise in der WO-A- 88/06181, in der Dissertation von U. Kessler (a.a.O) sowie von K. Fuchs in ZFL (1994) 45, 31 beschrieben. Auf die Offenbarung der obengenannten Druckschriften wird hiermit Bezug genommen.

15 Durch Agglomeration erhält man granuliert Mikroorganismenkulturen mit einer Korngröße im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 4 mm, insbesondere etwa 0,3 bis 2,5 mm.

20 Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist jedoch die Herstellung trockener Mikroorganismenkulturen, welche in Form besonders stark verdichteter Partikel vorliegen. Dies erfolgt erfindungsgemäß entweder durch Tablettierung in üblichen Tablettenpressen oder unter Anwendung üblicher, mit zwei gegenläufigen Walzen ausgerüsteter Kompaktiervorrichtungen.

25 Vor Durchführung der Verdichtung der erfindungsgemäß erhältlichen Pulverkonzentrate werden diesem gewöhnlich ein oder mehrere Co-formulantien oder Zuschlagsstoffe zugesetzt, um die Verarbeitbarkeit zum Endprodukt bzw. die Eigenschaften des Endproduktes zu modifizieren.

30 Zur Verbesserung der Fließfähigkeit des Pulverkonzentrates setzt man vorzugsweise ein Fließhilfsmittel zu. Als Beispiel für ein geeignetes Fließhilfsmittel sind zu nennen sprühgetrocknete Siliciumdioxidpulver, welche beispielsweise unter der Handelsbezeichnung Sipernat 50 erhältlich sind. Zur Verbesserung der Lagerstabilität der erfindungsgemäßen festen Formulierungen können außerdem übliche Antioxidanzien, wie z. B. L-Ascorbinsäure, zugesetzt werden. Außerdem können zusätzlich Trocknungsmittel des oben bereits beschriebenen Typs eingesetzt werden.

45 Die Wirkungsweise der erfindungsgemäßen Kulturen wird deutlich verbessert, wenn Vorkehrungen getroffen werden, die, nach Applikation der Kultur, zu einem schnellen Zerfall der Kornstruktur und somit zu einer raschen Freisetzung der Mikroorganismen führen. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, besteht in der Zugabe einer gut wasserlöslichen und damit den Zerfall der Kornstruktur

beschleunigenden Komponente. Als geeignete Verbindungen sind beispielsweise zu nennen Polyethylenglykole, welche z. B. unter der Handelsbezeichnung Pluriol E erhältlich sind.

- 5 Eine andere, erfindungsgemäß besonders bevorzugte Feststoffformulierung umfasst einen sogenannten Brausezusatz. Hierbei handelt es sich um eine gasfreisetzende Komponente, insbesondere eine CO₂-Quelle, wie z. B. um ein Erdalkalihydrogencarbonat, vorzugsweise Natriumhydrogencarbonat oder um Ammoniumhydrogencarbonat;
10 sowie um eine Säurekomponente, vorzugsweise ausgewählt unter Citronensäure, Ascorbinsäure oder Äpfelsäure. Dieser Brausezusatz bewirkt in Gegenwart von Feuchtigkeit eine spontane Gasentwicklung unter Zerfall der Kornstruktur und schneller Freisetzung der Mikroorganismenkeime.
15

- Insbesondere für die Herstellung stark verdichteter, kompaktierter oder tablettierter Mikroorganismenkulturen empfiehlt sich die Zugabe von Kompaktierungs- oder Tablettierungshilfsmitteln. Es
20 wurde nämlich erfindungsgemäß überraschenderweise festgestellt, dass durch Zugabe solcher Kompaktierungshilfsmittel die während der Kompaktierung auf die Mikroorganismen einwirkenden Drücke verringert und somit die Überlebensrate der Keime deutlich verbessert wird. Als Beispiele für geeignete Kompaktierhilfsmittel
25 sind zu nennen mikrokristalline Cellulose, Zucker sowie Mischungen davon. Als konkrete Beispiele für mikrokristalline Cellulose sind Produkte zu nennen, welche unter den Handelsnamen Avicel, Arbocel und Vivapur kommerziell erhältlich sind. Beispiele für geeignete Zucker sind Maltose, Maltodextrin sowie Lactosepräparate, welche unter den Handelsnamen Granulac, Tablettose oder
30 FloLac erhältlich sind. Als Beispiel für ein geeignetes Cellulose/Zuckermischprodukt ist zu nennen das Handelspräparat Cellactose. Als weiteres geeignetes Tablettierhilfsmittel zu nennen ist ein mit PVP granuliertes Lactosepräparat, erhältlich unter dem
35 Handelsnamen Ludipreß.

- Weitere geeignete Zusätze sind Polyethylenglykole (Mw 100 bis 10000) welche auf die in der Matrix eingebetteten Zellen eine
40 stabilisierende Wirkung besitzen können.

- Beiliegende Figur 1 zeigt ein Fließdiagramm für die erfindungsgemäße Weiterverarbeitung der Pulverkonzentrate zu einem erfindungsgemäßen kompaktierten Produkt. Pulverkonzentrat PK wird im
45 Mischer M1 mit den Coformulantien oder Zuschlagstoffen ZU vermischt, gelangt von dort aus in einen Vorratsbehälter B1, welcher

den Kompaktor A1 speist. Das vom Kompaktor austretende Produktband wird in den Mahlwerken Z1 und Z2 vorzerkleinert bzw. endzerkleinert und im Sieb F1 wird Produkt PR von Staubanteilen mit einer Korngröße von weniger als 0,3 mm abgetrennt. Dieses wird als
5 Rückgut RÜ dem Mischer M1 zugeführt. Das Produkt PR mit einer Korngröße von 0,3 mm oder mehr, wie z. B. 0,3 bis 1,5 mm, gelangt zur Abfüllung oder wird gegebenenfalls einer Weiterbehandlung, wie z. B. einem Coatingprozess, unterzogen.

10 Geeignete Coatingmaterialien, welche vorzugsweise den Zutritt von Feuchtigkeit zum Trockenpräparat zusätzlich erschweren sollen, sind beispielsweise alkoholische Lösungen von PVP, insbesondere eines PVP-Produktes, das unter der Handelsbezeichnung Kollidon
15 VA64 im Handel erhältlich ist. Ein anderes brauchbares Coatingsystem stellt ein Gemisch aus Shellac und Kollidon 25 oder 30 dar, welches mit Titandioxid und Talg supplementiert ist und ebenfalls in alkoholischer Lösung vorliegt.

20 Um die Zellzahl gegebenenfalls weiter zu verringern, kann ein auf diese Weise erhaltenes gecoatetes oder nicht-gecoatetes Produkt beispielsweise mit Kalk oder einem anderen geeigneten mineralischen Zusatz abgemischt werden.

25 Ausführungsbeispiele

In den folgenden Beispielen verwendete Analysenmethoden:

30 a) Bestimmung der Zellzahl:

Zellzahlbestimmungen wurden in der üblichen Art durch serielle Verdünnung mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung und anschließender
35 Plattierung auf MRS-Agar (Difco Laboratories) durchgeführt. Kolonienbildende Einheiten ("cfu") wurden nach 48-stündiger Bebrütung bei 37 °C gezählt. Es wurden nur solche Platten berücksichtigt, die mindestens 30 und höchstens 300 Kolonien enthielten. In der Regel wurden drei Platten pro Stufe ausgewertet und der Mittelwert gebildet.

40 Die spezifische Zellzahl einer Probe wurde rechnerisch ermittelt, indem die Zellzahl pro Gramm Probe durch den relativen Anteil des Trockengewichts der Probe geteilt wurde.

45 b) Bestimmung der Überlebensrate bei Trocknung:

Die Überlebensrate bei der Trocknung wurde errechnet aus der spezifischen Zellzahl der Probe vor der Trocknung geteilt durch die spezifische Zellzahl nach der Trocknung. Sie wurde stets in Prozent ausgedrückt.

5

c) Bestimmung der Lagerstabilität:

Um die Lagerstabilität einer getrockneten Probe zu bestimmen, wurde die spezifische Zellzahl der getrockneten Probe unmittelbar nach der Trocknung bestimmt (Tag_0). Das getrocknete Zellmaterial wurde unter Luft in einem lichtundurchlässigen, dicht verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur ($21\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) über längere Zeiträume gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde die spezifische Zellzahl erneut ermittelt (Tag_N). Die Lagerstabilität wurde errechnet aus dem Quotienten der spezifischen Zellzahl Tag_N /spezifischer Zellzahl Tag_0 .

Lag die spezifische Zellzahl nach der Trocknung z. B. bei $5 \cdot 10^{11}$ cfu/TS und nach 8 Wochen Lagerung bei $4 \cdot 10^{11}$ cfu/g TS, so betrug die Lagerstabilität 80 % des Ausgangswertes.

d) Messung des Feuchtegehaltes:

Elektronisches Feuchtebestimmungsgerät HR 73 der Fa. Mettler

25 Durchführung: ca. 2 g Pulver werden auf dem Messschälchen des Gerätes verteilt. Gemessen wird bei 105 °C Trocknungstemperatur bis zur Gewichtskonstanz (Abbruchkriterium: max. 1 mg Gewichtsverlust in 50 sec).

30 e) Messung der Wasseraktivität:

Gerät Hygroskop DT der Fa. Rotronic AG, Zürich, Schweiz

Das Produkt wird in die Messaufnahmeschale gegeben und diese in die auf 25 °C thermostatisierte Messkammer gestellt. Nach dem Schließen der Messkammer und einer Äquilibrierungszeit von 20 Minuten wird der Gerätemesswert abgelesen.

f) DSC-Messung zur Bestimmung der Glasübergangstemperatur T_g :

40 Gerät TA4000 der Fa. Mettler

Einwaage ca. 15 mg, Heizrate 20 °C/min , Proben wurden während der Messung mit einem Stickstoffstrom umspült.

DSC = Differential Scanning Calorimetry

45 Beispiele zur Kultivierung von Mikroorganismen

Beispiel K1: Batch Fermentation 10 Liter Maßstab

10 l eines Fermentationsmediums, welches folgende Bestandteile enthielt, wurden in einen 14 l-Fermenter gegeben und bei 121 °C für 30 Minuten sterilisiert:

Glucosemonohydrat	550,0 g
50 % Hefeextraktsuspension (pH 4,5 mit Phosphorsäure)	750,0 g
10 Tween 80®	10,0 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	5,0 g
MnSO ₄ * 1 H ₂ O	0,5 g

Nach der Sterilisation wurde das Medium mit steriler 25%iger Natronlauge auf pH 5,8 bei 37 °C eingestellt und das Medium mit einem sanften Strom sterilen Stickstoffs überlagert. Der Fermenter wurde mit 150 UPM gerührt.

Der Fermenter wurde dann mit 100 ml einer *Lactobacillus plantarum* Vorkultur (BASF Stamm LU 3244) beimpft, welche zuvor 16 h bei 37 °C in MRS-Nährmedium (Difco Laboratories) gewachsen war. Der pH-Wert der Kultur wurde kontinuierlich mit 25%iger Natronlauge auf 6,2 geregelt.

Der Verlauf der Fermentation wurde anhand des Natronlaugeverbrauchs verfolgt. Sobald keine Natronlauge mehr verbraucht wurde (Gesamtverbrauch 890 g), wurde die gesamte Fermentationsbrühe abgelassen und bei 8 °C zentrifugiert. Die Biomasse wurde in etwa 600 g Überstand resuspendiert und auf genau 1000 g mit Überstand aufgefüllt. Der Trockengewichtsanteil wurde mit Hilfe einer Infrarot-Trockenwaage bestimmt (105 °C bis Gewichtskonstanz). Der Feststoffgehalt dieser Suspension betrug 15 %.

Beispiel K2: Batch Fermentation 200 Liter Maßstab

35

180 l eines Fermentationsmediums, welches folgende Bestandteile enthielt, wurden in einen 200 l-Fermenter gegeben und bei 121 °C für 30 Minuten sterilisiert:

40 Glucosemonohydrat	11 kg
50 % Hefeextraktsuspension	15 kg
Tween 80®	200 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	200 g
MnSO ₄ * 1 H ₂ O	10 g

45

Nach der Sterilisation wurde das Medium mit steriler 25%iger Natronlauge auf pH 5,8 bei 37 °C eingestellt und das Medium mit einem sanften Strom sterilen Stickstoffs überlagert.

- 5 Der Fermenter wurde dann mit 2000 ml einer *Lactobacillus plantarum* Vorkultur (3244) beimpft, welche zuvor 24 h bei 30 °C in MRS-Nährmedium gewachsen war. Der pH-Wert der Kultur wurde kontinuierlich mit 25%iger Natronlauge geregelt.
- 10 Der Verlauf der Fermentation wurde anhand des Natronlaugeverbrauchs verfolgt. Insgesamt wurde 16,43 kg 25%iger NaOH verbraucht. Sobald keine Natronlauge mehr verbraucht wurde, wurde die gesamte Fermentationsbrühe abgelassen und bei 8 °C mit Hilfe eines kontinuierlichen Separators geerntet. Das Gewicht der ge-
- 15 ernteten Biomasse betrug nach der Zentrifugation 20 kg. Der Feststoffgehalt dieser Suspension betrug 12,3 %. Die Zellzahl der Suspension betrug $1,04 \cdot 10^{11}$ cfu/g Suspension. Die spezifische Zellzahl betrug $8,45 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (TS).

20 Beispiel K3: Batch Fermentation mit Temperaturschock

- Es wurde eine Fermentation analog Beispiel 2 durchgeführt. Bei einem Natronlaugenverbrauch entsprechend 90 % des zu erwartenden Wertes wurde die Fermentertemperatur auf 44 °C erhöht und gehalten,
- 25 ten, bis der gesamte vorgelegte Zucker verbraucht war. Anschließend wurden die Zellen, wie in Beispiel K2 beschrieben, geerntet. Die Zellzahl der Fermentationsbrühe betrug $1,8 \cdot 10^{11}$ cfu/g bei einem Feststoffgehalt von 21,17 %. Dies entspricht einer spezifischen Zellzahl von $8,5 \cdot 10^{11}$ cfu/g TS.

30

Beispiel K4: Kontinuierliche Fermentation

- 10 l eines Fermentationsmediums mit folgender Zusammensetzung wurden in einen 14 l-Fermenter eingefüllt und 30 Minuten bei
- 35 121 °C sterilisiert (Produktionsfermenter):

Glucosemonohydrat	400,0 g
50 % Hefeextraktsuspension (pH 4,5 mit Phosphorsäure)	500,0 g
40 KH_2PO_4	30,0 g
Zitronensäuremonohydrat	21,0 g
Tween 80®	10,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	5,0 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$	1,7 g
45 $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,4 g

In einem zweiten Fermenter mit einem Gesamtvolumen von 3 000 l wurden 2 000 l des gleichen Mediums eingefüllt und sterilisiert (Vorratsfermenter). Beide Fermenter wurden mit einer sterilisierbaren Leitung verbunden. Über ein Zwischengefäß, welches auf einer Waage stand, wurden dann mittels einer automatischen Steuerung jeweils 3 l frischen Mediums pro Stunde in den Produktionsfermenter gepumpt. Die Temperatur des Produktionsfermenters wurde auf 37 °C geregelt. Der pH-Wert wurde mit 25%iger NaOH auf 5,8 geregelt. Der Fermenter wurde mit 150 UpM gerührt und mit 0,1 VVM Stickstoff überlagert.

Über eine zweite Pumpe wurden jeweils 3 l Medium pro Stunde kontinuierlich abgezogen und in einem auf 0 bis 4 °C vorgekühlten Sammelbehälter aus Edelstahl gesammelt. Die Konzentration an Biomasse wurde turbidometrisch bestimmt und betrug 3,5 g/l. Die Glukosekonzentration im Auslauf des Produktionsfermenters betrug nach der anfänglichen Anwuchsphase zu allen Zeiten 0 g/l. Die Zellzahl der Fermentationsbrühe betrug $1,48 \cdot 10^{10}$ cfu/g Brühe. Der Trockengewichtsanteil der Fermentationsbrühe betrug 6,89 %, entsprechend 217 g TS. Die spezifische Zellzahl betrug $2,15 \cdot 10^{11}$ cfu/g TS.

Beispiel K5: Ernte der Zellen mit Waschschrift zur Entfernung von Natriumlactat

72 l Fermenteraustrag aus Beispiel K4 wurden kontinuierlich mit Hilfe eines handelsüblichen Separators bei 8 °C geerntet. Es wurden etwa 7 kg Zellsuspension gewonnen. Zu diesen wurde eine Waschlösung hinzugegeben, welche auf 40 l VE-Wasser, 450 g NaCl und 136 g KH_2PO_4 enthielt. Der pH-Wert der Waschlösung war zuvor mit 25%iger Natronlauge auf 7,0 eingestellt worden. Die etwa 50 l resuspendierter Zellen wurden erneut separiert. Es wurden 3 160 g konzentrierter, gewaschener Zellsuspension gewonnen. Der Feststoffgehalt der Suspension betrug 9,97 %. Die Zellzahl betrug $2,49 \cdot 10^{11}$ cfu/g Suspension. Die spezifische Zellzahl betrug $2,5 \cdot 10^{12}$ cfu/g TS.

Diese gewaschene Zellsuspension war praktisch frei von Natriumlactat. Die Biomassekonzentration wurde turbidometrisch bestimmt. Sie betrug 80 g/l.

Beispiele für Herstellung erfindungsgemäßer Pulverkonzentrate durch Sprühtrocknung

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Sprühtrocknungsversuche zur Herstellung erfindungsgemäßer Pulverkonzentrate werden in einem Labor-Sprühtrockner Typ Niro Minor der Fa. Niro, Kopenhagen,

Dänemark, durchgeführt. Die sprühfertige Bakteriensuspension wird über eine Zweistoffdüse zusammen mit vorkonditionierter, erhitzter Pressluft im Gleichstrom in den Trockenturm der Anlage eingesprüht, das getrocknete Produkt wird mit Hilfe eines Zyklons von der Luft abgetrennt und gesammelt.

Beispiel S1

Zur Herstellung einer Coformulantien-Lösung werden 200 ml VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) auf 60 °C erwärmt. Darin werden 150 g Süßmolkepulver, 7,5 g NaCl, 3,8 g KH₂PO₄, 3,8 g Zitronensäure und 3,8 g l-Ascorbinsäure gelöst, mit 40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt und mit VE-Wasser auf 400 g Gesamtmasse aufgefüllt. Diese Lösung wird auf 5 °C abgekühlt.

200 ml gewaschenes, d. h. im Wesentlichen natriumlactatfreies Ferment-Zentrifugat (hergestellt analog Beispiel K5) (12,7 % Feststoffgehalt (F.G.)) werden im Eisbad bei einer Temperatur von 5 °C vorgelegt und unter Rühren mit 400 g Coformulantien-Lösung, abgekühlt auf 5 °C, versetzt. Die Mischung aus Ferment-Zentrifugat und Coformulantien wird 30 Minuten bei 500 U/min mittels Magnetührer unter Eisbadkühlung nachgerührt. Anschließend wird die Mischung mittels Sprühtrocknung (Gerät Niro Minor) in ein Pulverkonzentrat A überführt, das am Zyklon abgeschieden wird. Dabei wird die Vorlage, aus der die Mischung zudosiert wird, auf 4 °C gekühlt, die Eintrittstemperatur beträgt 105 bis 110 °C, die Austrittstemperatur beträgt 53,5 bis 55,5 °C. Verwendet wird eine Zweistoffdüse, wobei konditionierte Luft (Taupunkt -25 °C) bei 4 bar zum Versprühen der Mischung aus Ferment-Zentrifugat und Coformulantien verwendet wird.

Das Pulverkonzentrat A wird in einem mit Stickstoff (Taupunkt = -40 °C) betriebenen Wirbelbett 2 Stunden bei Raumtemperatur nachgetrocknet, wobei man Pulverkonzentrat B erhält.

Charakterisierungen:

Sprühfertige Mischung: 35 % F.G., $2,84 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz

Pulverkonzentrat A: Wasseraktivität $a_w = 0,135$

Pulverkonzentrat B: Wasseraktivität $a_w = 0,076$,

Feuchtegehalt 3,4 %,

T_g aus DSC-Messung: 54 °C,

$1,98 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht 70 % Überlebensrate in der Trocknung)

Lagerstudie Pulver-

konzentrat B: cfu-Zahlen bei Raumtemperaturlagerung in unter Raumluft verschlossenen Gefäßen:
 $2,0 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (100 %)

Beispiel S2

- 5 Zur Herstellung einer Coformulantien-Lösung werden 200 ml VE-Wasser auf 70 °C erwärmt. Darin werden 75 g Maltodextrin (Glucidex IT6, Fa. Roquette), 75 g Lactose, 7,5 g NaCl, 3,8 g KH_2PO_4 , 3,8 g Zitronensäure und 3,8 g l-Ascorbinsäure gelöst, mit 40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt und mit VE-Wasser auf 400 g
- 10 Gesamtmasse aufgefüllt. Diese Lösung wird auf 5 °C abgekühlt.

- 200 ml gewaschenes, d. h. im Wesentlichen natriumlactatfreies Ferment-Zentrifugat (16,5 % F.G.; hergestellt analog Beispiel K5) bei 5 °C unter Rühren in 400 g Coformulantien-Lösung, abgekühlt
- 15 auf 5 °C, eingemischt. Die Mischung wird 30 Minuten bei 250 U/min mittels Magnetrührer unter Eisbadkühlung gerührt. Danach werden 101 ml eines nach EP-A-0 479 066 (BASF) hergestellten Solubilisates aus 25 % Tween 80, 5 % β -Carotin und 2 % α -Tocopherol zugegeben und unter Eisbadkühlung 10 Minuten nachgerührt. Anschließend
- 20 wird diese Mischung mittels Sprühtrocknung, wie in Beispiel S1 beschrieben, in ein Pulverkonzentrat A überführt (Eintrittstemperatur 105 °C, Austrittstemperatur 54 bis 55 °C). Das Pulverkonzentrat A wird nicht nachgetrocknet.

25 Charakterisierungen:

Sprühfertige Mischung: 29 % F.G., $3,84 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz

Pulverkonzentrat A: Wasseraktivität $a_w = 0,065$,

Feuchtegehalt 2,8 %,

T_g aus DSC-Messung: 61 °C,

- 30 $2,22 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht 58 % Überlebensrate in der Trocknung)

Lagerstudie Pulverkonzentrat A:

cfu-Zahlen bei Raumtemperaturlagerung in unter Raumluft verschlossenen Gefäßen:

- 35 $1,9 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (86 %) nach 30 Tagen

40

Beispiel S3

- 400 ml ungewaschenes, d. h. natriumlactathaltiges Ferment-Zentrifugat (hergestellt analog Beispiel K4) (14,3 % F.G.) werden im
- 45 Eisbad bei einer Temperatur von 5 °C vorgelegt. Unter Rühren bei 700 U/min mittels Magnetrührer gerührt werden nun 57,2 g Glucidex IT6, 8,6 g l-Ascorbinsäure und 5,7 % Natriumglutamat als Fest-

stoffe in das gekühlte Ferment-Zentrifugat eingerührt. Der pH wird mit 40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Mischung aus Ferment-Zentrifugat und Coformulantien wird 30 Minuten bei 500 U/min mittels Magnetrührer bei ca. 3 °C unter Eisbadkühlung nachgerührt. Anschließend wird die Mischung mittels Sprühtrocknung, wie in Beispiel S1 beschrieben, in ein Pulverkonzentrat A überführt (Eintrittstemperatur 105 °C; Austrittstemperatur 54,5 bis 55,5 °C).

- 10 Das Pulverkonzentrat A wird in einem mit Stickstoff betriebenen Wirbelbett 2 Stunden bei Raumtemperatur nachgetrocknet, wobei man ein Pulverkonzentrat B erhält.

Charakterisierungen:

- 15 Sprühfertige Mischung: 27 % F.G., $4,65 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz
Pulverkonzentrat A: Wasseraktivität $a_w = 0,197$
Pulverkonzentrat B: Wasseraktivität $a_w = 0,072$,
Feuchtegehalt 3,8 %,
 T_g aus DSC-Messung: 52 °C,
20 $4,64 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht
100 % Überlebensrate in der Trocknung)
Lagerstudie Pulverkonzentrat B: cfu-Zahlen bei Raumtemperaturlagerung in
unter Raumluft verschlossenen Gefäßen:
25 $4,1 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (88 %) nach 28 Tagen

Beispiel S4

- 30 215 ml gewaschenes, d. h. im Wesentlichen natriumlactatfreies Ferment-Zentrifugat (hergestellt analog Beispiel K5) (14,5 % F.G.) werden im Eisbad bei einer Temperatur von 5 °C vorgelegt. Unter Rühren bei 700 U/min mittels Magnetrührer werden nun 31,2 g Glucidex IT6, 4,7 g Ascorbinsäure und 3,1 % Natriumglutamat als
35 Feststoffe in das gekühlte Ferment-Zentrifugat eingerührt. Der pH wird mit 40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Mischung aus Ferment-Zentrifugat und Coformulantien wird 30 Minuten bei 500 U/min mittels Magnetrührer unter Eisbadkühlung nachgerührt. Anschließend wird die Mischung mittels Sprühtrocknung, wie
40 in Beispiel S1 beschrieben, in ein Pulverkonzentrat A überführt (Eintrittstemperatur 105 °C; Austrittstemperatur 54,5 bis 55,5 °C).

- Das Pulverkonzentrat A wird in einem mit Stickstoff betriebenen
45 Wirbelbett 2 Stunden bei Raumtemperatur nachgetrocknet, wobei man Pulverkonzentrat B erhält.

Charakterisierungen:

Sprühfertige Mischung: 28 % F.G., $8,76 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz

Pulverkonzentrat B: Wasseraktivität $a_w = 0,044$,
Feuchtegehalt 3,8 %,

- 5 T_g aus DSC-Messung: 48 °C,
 $7,17 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht
82 % Überlebensrate in der Trocknung)

Lagerstudie Pulver-
konzentrat B:

- 10 cfu-Zahlen bei Raumtemperaturlagerung in
unter Raumluft verschlossenen Gefäßen:
 $3,7 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (52 %)
nach 27 Tagen

Beispiel S5

- 15 Zur Herstellung einer Coformulantien-Lösung 1 werden 40 ml VE-
Wasser vorgelegt und darin 33,3 g Lactose und 6,3 g Pepton ge-
löst, mit VE-Wasser auf 83 g Gesamtmasse aufgefüllt und mit
40 %igem wässrigem NaOH auf pH 7 eingestellt. Zur Herstellung ei-
20 ner Coformulantien-Lösung 2 werden 40 ml VE-Wasser vorgelegt und
darin 33,3 g Glucose-1-hydrat und 5,4 g Zitronensäure gelöst, mit
VE-Wasser auf 83 g Gesamtmasse aufgefüllt und mit 40 %igem wäss-
rigem NaOH auf pH 7 eingestellt. Diese Lösungen 1 und 2 werden
auf 5 °C abgekühlt.
- 25 200 ml gewaschenes, d. h. im Wesentlichen natriumlactatfreies
Ferment-Zentrifugat (hergestellt analog Beispiel K5) (12,7 % F.G.)
werden im Eisbad bei ca. 4 °C unter Rühren mit 83 g der abgekühl-
ten Coformulantien-Lösung 1 vermischt. Die Mischung wird 30 Minu-
30 ten unter Eisbadkühlung gerührt. Danach werden unter Rühren 83 g
der abgekühlten Coformulantien-Lösung 2 zugegeben und unter Eis-
badkühlung 30 Minuten nachgerührt. Anschließend wird diese Mi-
schung mittels Sprühtrocknung, wie in Beispiel S1 beschrieben, in
ein Pulverkonzentrat A überführt (Eintrittstemperatur 105 °C; Aus-
35 trittstemperatur 55 °C).

Das Pulverkonzentrat A wird in einem mit Stickstoff betriebenen
Wirbelbett 2 Stunden bei Raumtemperatur nachgetrocknet, wobei man
Pulverkonzentrat B erhält.

40

Charakterisierungen:

Sprühfertige Mischung: 29 % F.G., $7,30 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz

Pulverkonzentrat B: Wasseraktivität $a_w = 0,139$,
Feuchtegehalt 3,7 %,

- 45 T_g aus DSC-Messung: 45 °C,
 $5,06 \cdot 10^{11}$ cfu/g Trockensubstanz (entspricht
69 % Überlebensrate in der Trocknung)

Lagerstudie Pulver-
konzentrat B:

cfu-Zahlen bei Raumtemperaturlagerung in
unter Raumluft verschlossenen Gefäßen:
4,8·10¹¹ cfu/g Trockensubstanz (95 %) nach 21 Tagen

5

Beispiel S6

Die Herstellung der sprühfertigen Mischungen erfolgte analog zu
10 Beispiel S3. Verwendet wurden hier aber zwei unterschiedliche
Ferment-Zentrifugate:

Beispiel S6a: Batch-Fermentation, wobei das Ferment gegen Ende
der Fermentation für 40 Minuten auf 4 °C gekühlt wurde.

15

Das in der Sprühtrocknung gemäß Beispiel S1 (Eintrittstemperatur
107 bis 111 °C; Austrittstemperatur 58 bis 61 °C) erhaltene Pul-
verkonzentrat A wurde nicht nachgetrocknet.

20 Charakterisierungen:

Sprühfertige Mischung: 3,68·10¹¹ cfu/g Trockensubstanz
Pulverkonzentrat A: 0,76·10¹¹ cfu/g Trockensubstanz (entspricht
21 % Überlebensrate in der Trocknung)

25 Beispiel S6b: Batch-Fermentation, wobei das Ferment gegen Ende
der Fermentation auf 44 °C erhitzt wurde. In diesem Beispiel wurde
die sprühfertige Mischung geteilt. In einem ersten Versuch wurde
das Vorlagegefäß wie in den Beispielen S1 bis S5 und S6a auf 4 °C
thermostatisiert. In einem zweiten Versuch wurde das Vorlagegefäß
30 auf 20 °C thermostatisiert.

Die in der Sprühtrocknungen gemäß Beispiel S1 (Eintrittstempera-
tur 103 bis 110 °C; Austrittstemperatur 59 bis 61 °C) erhaltenen
Pulverkonzentrate A wurde nicht nachgetrocknet.

35

Charakterisierungen für Vorlage bei 4 °C:

Sprühfertige Mischung: 3,53·10¹¹ cfu/g Trockensubstanz
Pulverkonzentrat A: 2,36·10¹¹ cfu/g Trockensubstanz (entspricht
67 % Überlebensrate in der Trocknung)

40

Charakterisierungen für Vorlage bei 20 °C:

Sprühfertige Mischung: 3,53·10¹¹ cfu/g Trockensubstanz
Pulverkonzentrat A: 1,48·10¹¹ cfu/g Trockensubstanz (entspricht
42 % Überlebensrate in der Trocknung)

45

Formulierungsbeispiele

Entsprechend den im Folgenden angegebenen Rezepturen wurden Trockenmischungen von erfindungsgemäßen Pulverkonzentraten hergestellt und zu kompaktierten Starterkulturpräparaten verarbeitet:

Wenn keine anderen Angaben gemacht wurden, wurde als Trennmittel Leucin und als Fließhilfsmittel Sipernat 50S (sprühgetrocknetes Siliziumdioxid) verwendet.

10

Die Einzelkomponenten der Präparate werden zunächst miteinander vermischt. Hierzu verwendet man beispielsweise einen Pflugscharmischer (Typ LÖ 20 der Fa. Lödige). Die auf diese Weise erhaltene Trockenmischung wird in einem Kompaktor kompaktiert. Beispielsweise kann man hierzu einen Laborkompaktor verwenden, der eine Presskraft von 14 kN/cm² aufbringt (z. B. Laborkompaktor L 200 der Fa. Bepex). Das aus dem Kompaktor austretende Produktband wird anschließend auf eine Teilchengröße von $\leq 1,25$ mm zerkleinert. Das Rohgranulat wird zur Abtrennung von Feingut einer Teilchengröße von $\leq 0,3$ mm gesiebt. Die Nutzgutausbeute beträgt etwa 50 bis 60 % des eingesetzten Materials.

Beispiel F1: Herstellung eines Brausekompaktats zur Verwendung als Starterkultur für Silage

25

Präparat A:

Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S2)	200,0 g
Zitronensäure, wasserfrei	95,0 g
NaHCO ₃	95,0 g
30 PEG (M _w < 400)	8,0 g
Fließhilfsmittel	2,0 g

Präparat B:

Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S2)	100,0 g
35 Ascorbinsäure, Pulver	47,5 g
NaHCO ₃	47,5 g
PEG (M _w < 400)	4,0 g
Fließhilfsmittel	1,0 g

40 Präparat C:

Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S2)	100,0 g
Äpfelsäure	47,5 g
NaHCO ₃	47,5 g
PEG (M _w < 400)	4,0 g
45 Fließhilfsmittel	1,0 g

Präparat D:

	Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S2)	100,0 g
	Zeolith A (Wessalith P)	20,0 g
	Ascorbinsäure, Pulver	37,0 g
	NaHCO ₃	36,8 g
5	Trennmittel	3,0 g
	Fließhilfsmittel	3,0 g

Beispiel F2: Herstellung eines schnelllöslichen Kompaktats ohne Brausezusatz

10

	Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S2)	100,0 g
	wasserlösl. Tensid (Pluriol EL 500)	90,0 g
	Trennmittel	7,0 g
	Fließhilfsmittel	3,0 g

15

Beispiel F3: Herstellung eines Kompaktats

	Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S5)	100,0 g
	Kompaktierhilfsmittel ¹⁾	90,0 g
20	Trennmittel	7,0 g
	Fließhilfsmittel	3,0 g

1) ausgewählt unter: Avicel PH 102, Vivapur 105, FlowLac, Mal-tex 20, Cellactose oder Gemische davon

25 Beispiel F4: Herstellung stabilisierter Kompaktate

Basisrezeptur:

30	Pulverkonzentrat (gemäß Beispiel S5)	100,0 g
	Kompaktierhilfsmittel	50,0 g
	Stabilisator	vgl. Tabelle I
	Trennmittel	7,0 g
	Fließhilfsmittel	3,0 g

35

40

45

Tabelle I

5	Stabilisator	Komponente	Menge (g)
	A	Zeolith A	40
	B	PEG 4000	40
	C	Ascorbinsäure ¹⁾	40
10	D	PEG 4000 Ascorbinsäure	20 20
	E	Zeolith A Ascorbinsäure	20 20
15	F	Zeolith A Ascorbinsäure PEG 4000	20 3 17
	G	Zeolith A Ascorbinsäure PEG 4000	10 1,5 8,5
20	H	Zeolith A Ascorbinsäure PEG 4000	7 1 6

¹⁾ jeweils 1-Ascorbinsäure

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Trockene Mikroorganismenkultur, enthaltend wenigstens eine
5 Mikroorganismen-Spezies in geträgerter Form, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultur in Form von Partikeln vorliegt, welche
 - a) eine Partikelgröße von wenigstens etwa 0,1 mm aufweisen
10 und
 - b) verdichtet sind.
2. Mikroorganismenkultur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
15 net, dass die verdichteten Partikel kompaktiertes Brechgut mit einem Durchmesser von etwa 0,1 mm bis etwa 2 mm umfassen.
3. Mikroorganismenkultur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
20 net, dass die verdichteten Partikel Tabletten mit einem Durchmesser von etwa 2 bis 50 mm und einem Verhältnis von Durchmesser zu Dicke von etwa 1:0,1 bis etwa 10:1 umfassen.
4. Mikroorganismenkultur nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
25 che, dadurch gekennzeichnet, dass sie als weitere Komponente einen Brausezusatz umfasst.
5. Mikroorganismenkultur nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
30 che, dadurch gekennzeichnet, dass sie als Träger wenigstens ein Matrixmaterial zur Einbettung der Mikroorganismenzellen und gegebenenfalls wenigstens ein weiteres, die Zellen stabilisierendes Additiv umfasst.
6. Mikroorganismenkultur nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
35 che, dadurch gekennzeichnet, dass sie etwa 10^8 bis 10^{12} cfu/g wenigstens einer Mikroorganismen-Spezies enthält.
7. Mikroorganismenkultur nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
40 che, dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens eine Milchsäure produzierende Bakterienspezies enthält.
8. Mikroorganismenkultur nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet,
45 net, dass die Bakterienspezies ausgewählt ist unter Bakterien der Gattung *Lactobacillus* sp.

9. Verfahren zur Herstellung einer trockenen Mikroorganismenkultur, enthaltend wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies in geträgerter Form, dadurch gekennzeichnet, dass man
- 5 a) in einer wenigstens eine Mikroorganismen-Spezies enthaltende Flüssigkeit wenigstens eine zur Ausbildung eines Trägers geeignete Substanz löst oder suspendiert,
- 10 b) das so erhaltene Gemisch in einem Sprühtrockner trocknet, wobei man zur Sprühtrocknung ein konditioniertes, getrocknetes und auf eine Temperatur im Bereich von mehr als etwa 80 °C erhitztes Gas verwendet, und
- 15 c) das Trockengut aus dem Sprühtrockner entfernt, wobei dieses eine Austrittstemperatur von etwa 45 bis 75 °C aufweist.
10. Verfahren Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das in Stufe b) verwendete getrocknete Gas einen Taupunkt von weniger als etwa +5 °C aufweist.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass man in einer weiteren Stufe d) das Trockengut einer Nach Trocknung bei einer Temperatur im Bereich von etwa 15 bis 50 °C in einer Gasatmosphäre oder im Vakuum unterzieht und/oder mit wenigstens einem Trocknungsmittel versetzt.
- 25 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Trockengut ein Pulverkonzentrat mit einem Gehalt an lebensfähigen Mikroorganismen von etwa $5 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^{12}$ cfu/g erhält.
- 30 13. Verfahren zur Herstellung einer trockenen Mikroorganismenkultur gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man
- 35 i) durch trägergebundene Sprühtrocknung, trägergebundene Gefriertrocknung oder trägergebundene Wirbelschichttrocknung ein Pulverkonzentrat der Mikroorganismenkultur herstellt,
- 40 ii) das Pulverkonzentrat gegebenenfalls mit einem oder mehreren Coformulantien versetzt und
- 45 iii) diese Mischung kompaktiert oder tablettiert.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man das kompaktierte Pulverkonzentrat aus Stufe iii) bricht und gegebenenfalls klassiert.

5 15. Verfahren zur Herstellung einer trockenen, agglomerierten Mikroorganismenkultur, dadurch gekennzeichnet, dass man

10 i) durch trägergebundene Sprühtrocknung, trägergebundene Gefriertrocknung oder trägergebundene Wirbelschichttrocknung ein Pulverkonzentrat der Mikroorganismenkultur herstellt,

15 ii) das Pulverkonzentrat gegebenenfalls mit einem oder mehreren Coformulantien versetzt und

iii) diese Mischung agglomeriert.

20 16. Verfahren nach Anspruch 13 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Sprühtrocknung wie in einem der Ansprüche 9 bis 12 erfolgt.

25 17. Verwendung einer Mikroorganismenkultur nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder hergestellt nach einem der Ansprüche 9 bis 16, als Starterkultur für Nahrungs- und Futtermittel.

18. Nahrungs- und Futtermittel, erhältlich unter Verwendung einer Mikroorganismenkultur nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder hergestellt nach einem der Ansprüche 9 bis 16, als Starter.

30

58/it

35

40

45

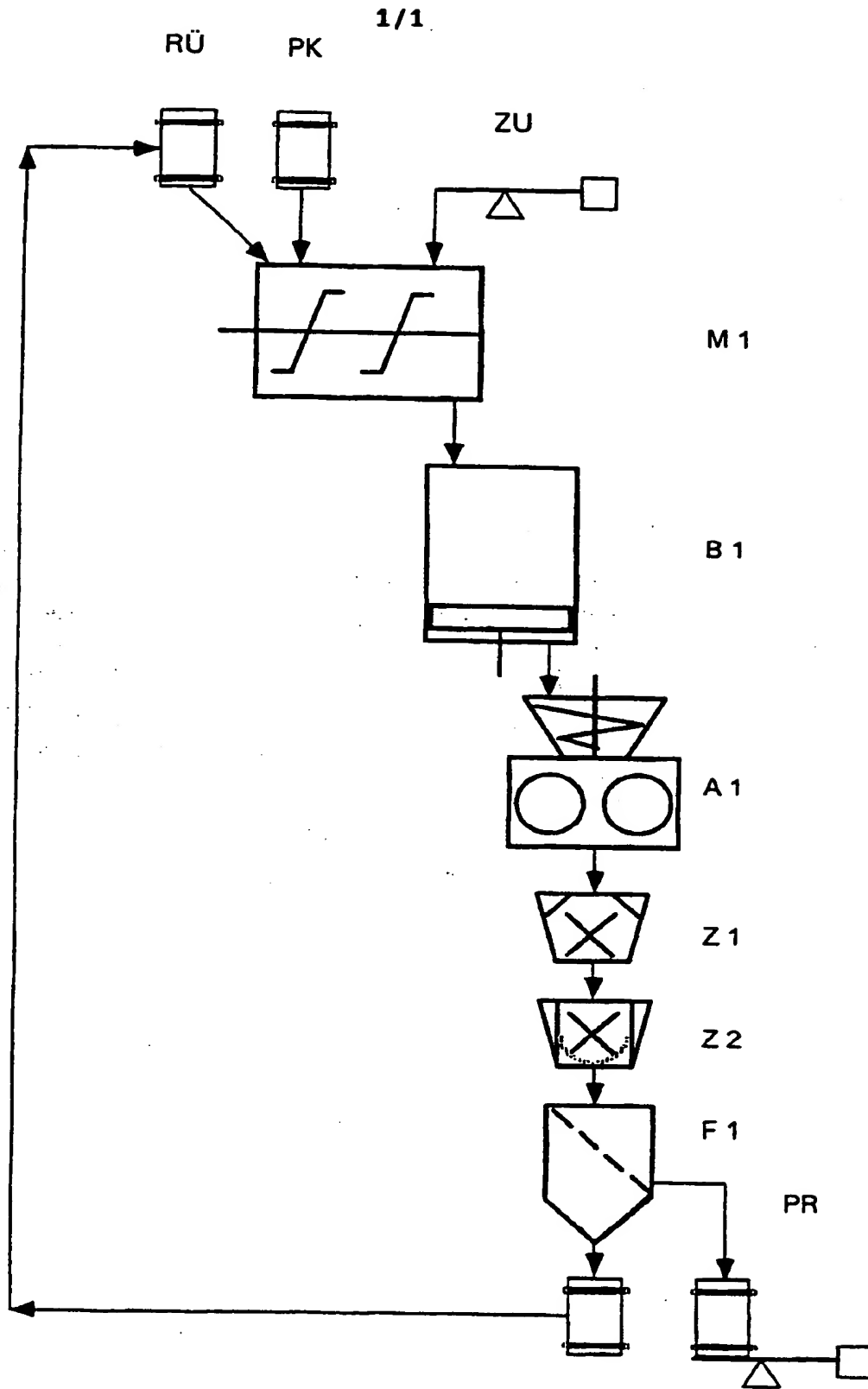


Fig.1

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/EP 99/02925

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N1/04 A23K3/03 A23L1/03 A23K1/00 //(C12N1/04,
C12R1:25)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A23K A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 247 253 A (DSO PHARMACHIM) 9 May 1975 (1975-05-09) examples 1-3 claim 3	1-3, 5, 7-9, 13, 15, 16
X	US 3 407 072 A (AIZAWA MINORU ET AL) 22 October 1968 (1968-10-22) abstract; examples 1-7	9
X	US 3 536 498 A (ANO TOSHICHI ET AL) 27 October 1970 (1970-10-27) abstract; examples 1-7, 10-13	9
X	US 3 897 307 A (PORUBCAN RANDOLPH S ET AL) 29 July 1975 (1975-07-29) example 3; table III	9, 12
A	column 7, line 66 - column 8, line 8 -/--	13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 1999

Date of mailing of the international search report

03/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/02925

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 8745 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 87-319054 XP002113266 & SU 1 292 706 A (APPL BIOCHEM RES), 28 February 1987 (1987-02-28) abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	9,10
X	<p>EP 0 520 748 A (PAFRA LTD) 30 December 1992 (1992-12-30) abstract; examples 7-10</p> <p style="text-align: center;">---</p>	9,12
X	<p>GB 1 073 030 A (GRIFFON ET AL) 21 June 1967 (1967-06-21) table II</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3,6
X	<p>GB 2 016 043 A (DANOCHEMO AS) 19 September 1979 (1979-09-19) abstract examples 1,3</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,5,7,8, 13,15
A	<p>EP 0 818 529 A (NESTLE SA) 14 January 1998 (1998-01-14) page 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/02925

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2247253	A	09-05-1975	BG 19633 A	10-10-1975
			AR 201790 A	15-04-1975
			AT 336782 B	25-05-1977
			AT 812974 A	15-09-1976
			CS 191452 B	31-07-1979
			DD 114222 A	20-07-1975
			DE 2448648 A	24-04-1975
			GB 1439738 A	16-06-1976
			JP 50088209 A	15-07-1975
			NL 7413373 A	15-04-1975
			SE 7412625 A	14-04-1975
			US 3988440 A	26-10-1976
			YU 274574 A	30-06-1982
US 3407072	A	22-10-1968	NONE	
US 3536498	A	27-10-1970	BE 702202 A	15-01-1968
			FR 1535830 A	
			GB 1146367 A	
			NL 6710736 A,B	05-02-1968
US 3897307	A	29-07-1975	AU 473243 B	17-06-1976
			AU 8014475 A	17-06-1976
			BE 828181 A	18-08-1975
			CA 1041929 A	07-11-1978
			CH 596302 A	15-03-1978
			DE 2520128 A	29-04-1976
			DK 199975 A,B	24-04-1976
			FR 2299404 A	27-08-1976
			GB 1469218 A	06-04-1977
			IT 1049418 B	20-01-1981
			NL 7505227 A	27-04-1976
			SE 422079 B	15-02-1982
			SE 7507580 A	26-04-1976
SU 1292706	A	28-02-1987	NONE	
EP 0520748	A	30-12-1992	AU 659645 B	25-05-1995
			AU 1848692 A	07-01-1993
			CA 2072420 A	27-12-1992
			EP 0906951 A	07-04-1999
			JP 5293354 A	09-11-1993
			US 5928469 A	27-07-1999
GB 1073030	A		NONE	
GB 2016043	A	19-09-1979	DE 2908639 A	13-09-1979
			DK 76779 A	09-09-1979
			FR 2419031 A	05-10-1979
			SE 7902104 A	09-09-1979
EP 0818529	A	14-01-1998	AU 2851597 A	15-01-1998
			BR 9703941 A	01-09-1998
			CA 2208727 A	09-01-1998
			CN 1173974 A	25-02-1998
			JP 10057031 A	03-03-1998
			NZ 328264 A	29-06-1999

This Page Blank (uspto)

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N1/04 A23K3/03 A23L1/03 A23K1/00 //(C12N1/04,
C12R1:25)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A23K A23L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 247 253 A (DSO PHARMACHIM) 9. Mai 1975 (1975-05-09) Beispiele 1-3 Anspruch 3	1-3,5, 7-9,13, 15,16
X	US 3 407 072 A (AIZAWA MINORU ET AL) 22. Oktober 1968 (1968-10-22) Zusammenfassung; Beispiele 1-7	9
X	US 3 536 498 A (ANO TOSHICHI ET AL) 27. Oktober 1970 (1970-10-27) Zusammenfassung; Beispiele 1-7,10-13	9
X	US 3 897 307 A (PORUBCAN RANDOLPH S ET AL) 29. Juli 1975 (1975-07-29) Beispiel 3; Tabelle III	9,12
A	Spalte 7, Zeile 66 - Spalte 8, Zeile 8 -/-	13



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. August 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/09/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lejeune, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 8745 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 87-319054 XP002113266 & SU 1 292 706 A (APPL BIOCHEM RES), 28. Februar 1987 (1987-02-28) Zusammenfassung</p> <p>---</p>	9,10
X	<p>EP 0 520 748 A (PAFRA LTD) 30. Dezember 1992 (1992-12-30) Zusammenfassung; Beispiele 7-10</p> <p>---</p>	9,12
X	<p>GB 1 073 030 A (GRIFFON ET AL) 21. Juni 1967 (1967-06-21) Tabelle II</p> <p>---</p>	1-3,6
X	<p>GB 2 016 043 A (DANOCHEMO AS) 19. September 1979 (1979-09-19) Zusammenfassung Beispiele 1,3</p> <p>---</p>	1,5,7,8, 13,15
A	<p>EP 0 818 529 A (NESTLE SA) 14. Januar 1998 (1998-01-14) Seite 2</p> <p>-----</p>	1-18

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02925

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR 2247253 A	09-05-1975	BG 19633 A	10-10-1975
		AR 201790 A	15-04-1975
		AT 336782 B	25-05-1977
		AT 812974 A	15-09-1976
		CS 191452 B	31-07-1979
		DD 114222 A	20-07-1975
		DE 2448648 A	24-04-1975
		GB 1439738 A	16-06-1976
		JP 50088209 A	15-07-1975
		NL 7413373 A	15-04-1975
		SE 7412625 A	14-04-1975
		US 3988440 A	26-10-1976
		YU 274574 A	30-06-1982
US 3407072 A	22-10-1968	KEINE	
US 3536498 A	27-10-1970	BE 702202 A	15-01-1968
		FR 1535830 A	
		GB 1146367 A	
		NL 6710736 A,B	05-02-1968
US 3897307 A	29-07-1975	AU 473243 B	17-06-1976
		AU 8014475 A	17-06-1976
		BE 828181 A	18-08-1975
		CA 1041929 A	07-11-1978
		CH 596302 A	15-03-1978
		DE 2520128 A	29-04-1976
		DK 199975 A,B	24-04-1976
		FR 2299404 A	27-08-1976
		GB 1469218 A	06-04-1977
		IT 1049418 B	20-01-1981
		NL 7505227 A	27-04-1976
		SE 422079 B	15-02-1982
		SE 7507580 A	26-04-1976
SU 1292706 A	28-02-1987	KEINE	
EP 0520748 A	30-12-1992	AU 659645 B	25-05-1995
		AU 1848692 A	07-01-1993
		CA 2072420 A	27-12-1992
		EP 0906951 A	07-04-1999
		JP 5293354 A	09-11-1993
		US 5928469 A	27-07-1999
GB 1073030 A		KEINE	
GB 2016043 A	19-09-1979	DE 2908639 A	13-09-1979
		DK 76779 A	09-09-1979
		FR 2419031 A	05-10-1979
		SE 7902104 A	09-09-1979
EP 0818529 A	14-01-1998	AU 2851597 A	15-01-1998
		BR 9703941 A	01-09-1998
		CA 2208727 A	09-01-1998
		CN 1173974 A	25-02-1998
		JP 10057031 A	03-03-1998
		NZ 328264 A	29-06-1999

This Page Blank (uspto)